

Supervivencia en agua de bebida de una cepa *Lactobacillus* sp. aislada de intestino de pollo

Oscar Zambrano Santisteban

Centro de Estudio de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria,
Universidad de Granma, Bayamo, Cuba

e-mail oscarzam@udg.co.cu

Resumen

Una cepa de *Lactobacillus* sp. aislada de intestino de pollo, se cultivó en 10 mL de caldo M.R.S. a 37 °C por 18 horas en anaerobiosis. Este cultivo se centrifugó a 2 000 gravedades por 10 min a 4 °C ; el sedimento se lavó dos veces en solución salina fisiológica estéril; del sedimento se preparó una concentración celular de $0,6 \times 10^8$ ufc/mL , y a partir de ella, se transfirió 1 mL a cada uno de 63 tubos bacteriológicos que contenían 10 mL de agua potable estéril. Estos tubos fueron guardados en un lugar fresco a temperatura de habitación por un período de tres meses. El conteo de gérmenes viables se realizó en agar M.R.S. a los dos, tres, ocho, 30; 60 y 90 días de exposición. Se comprobó que la cepa mantuvo su concentración inicial de $7,77 \times 10^8$ ufc/mL sin diferencias significativas los tres primeros días, para comenzar a declinar significativamente hasta los 90 días, cuando se encontró $7,3 \times 10^8$ ufc/mL de viables. Se concluye que la cepa posee una alta supervivencia en el agua de bebida, siendo este un carácter básico para ser utilizada como probiótico en la producción avícola.

Abstract

A *Lactobacillus* sp. strain isolated from chicken bowels was put into a 10 mL M.R.S. broth at 37 °C for 18 hours in anaerobic jar. The culture was centrifuged at 2 000 gravities per 10 min at 4 °C. The sediment thus obtained was washed twice in a physiologic saline solution. A $0,6 \times 10^8$ ufc/mL cell concentration solution was prepared out of the washed sediment, and 1 mL of this solution was put into every 63 bacteriological test tubes containing 10 mL sterilized water each. The test tubes were kept in a fresh place at room temperature for three months. Viable germ counting was carried out in the M.R.S. agar at 2; 3; 8; 30; 60; and 90 days exposure. The *Lactobacillus* sp. strain did not change its initial concentration of $7,77 \times 10^8$ ufc/mL. No significant differences were detected during the first three days; however, a remarkable drop was observed from the third day on and up to the ninetieth when a $7,3 \times 10^7$ ufc/mL viable were found. Thus the higher water survival of this strain has proved useful as a probiotic one for fowl production.

PALABRAS CLAVE: *Supervivencia, Lactobacillus* sp., agua de bebida, probiótico, concentración

Introducción

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando son administrados a través de la vía digestiva, producen resultados positivos en la salud del huésped (Miltenburg, 1999; Serrano *et al.*, 2000; Guillot, 2001; Amigo *et al.*, 2002).

La utilidad de los preparados probióticos depende de que exista en ellos un número adecuado de organismos para que puedan formar una colonia en el tracto gastrointestinal, y establecer una relación simbiótica en el animal huésped

(Arias, 1998; Simon, 1998; Castellanos *et al.*, 1999; Apajalahti y Bedford, 2000; La Ragione *et al.*, 2001).

Los probióticos están disponibles en polvo, en grano y en forma líquida, estos últimos para usarlos como aditivos en el agua (Ensminger *et al.*, 1999). Se ha comprobado que una de las causas de variación en los resultados es la dosis y las formas de administración.

Por ejemplo, la granulación del pienso somete a los microorganismos a temperaturas y presiones que no pueden resistir (Delbecque, 1991). Por ello se requiere perfeccionar sus métodos tecnológicos con el fin de proteger a las bacterias no esporuladas como los *Lactobacillus* (Guillot, 2001).

Este trabajo tiene como objetivo valorar la capacidad de supervivencia de una cepa de *Lactobacillus* sp. en agua de bebida, como criterio para avalar su potencialidad probiótica en la producción avícola y las posibilidades del agua. como vía a suministrarlo a los animales.

Materiales y Métodos

La cepa de *Lactobacillus* sp. aislada del intestino de pollo utilizada en este trabajo, fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Granma, Cuba.

La cepa de *Lactobacillus* sp. se sembró en agar M.R.S. (Difco) e incubó a 37 °C por 24 horas en anaerobiosis (Gas Pak system, BBL, Cockeysville, U.S.A); después se resembró en 10 mL de caldo M.R.S. pH 6,8; y se incubó a 37 °C por 18 horas en anaerobiosis (Gas Pak system). Este cultivo se centrifugó a 2 000 gravedades por 10 min a 4 °C (Beckman Avanti™ 30), el sedimento se lavó dos veces en solución salina fisiológica estéril; (8,5 g/L NaCl), posteriormente se resuspendió en 2 mL de solución salina fisiológica estéril, de esta suspensión, se preparó una concentración celular de $0,6 \times 10^8$ ufc/mL (standard de McFarland) y a partir de ella, se transfirió 1 mL a cada uno de los tubos bacteriológicos (63 tubos) que contenían 10 mL de agua potable normalmente empleada en la alimentación de las aves comerciales, previa esterilización (en autoclave a 121 °C por 15 min). Estos tubos fueron guardados en un lugar fresco a temperatura de habitación por un período de tres meses. El muestreo de supervivencia se realizó a los dos, tres, ocho, 30; 60 y 90 días. Se investigaron 9 tubos para cada tiempo de exposición. El conteo de gérmenes viables se realizó mediante el método de las diluciones consecutivas base 10, cada dilución se sembró en placas de agar M.R.S. (tres placas por dilución) incubadas a 37 °C durante 72 horas. Los resultados se evaluaron utilizando el paquete estadístico 6.0 Statistica for Windows 1996.

Resultados y Discusión

En la tabla se observan los valores promedios del log de ufc/mL viables de *Lactobacillus* sp. en el agua de bebida durante el experimento. Se aprecia que la cepa mantuvo su concentración inicial de $7,77 \times 10^8$ ufc/mL sin diferencias significativas los tres primeros días, para comenzar a declinar significativamente a los ocho días hasta los 90 días, donde se encontró $7,3 \times 10^8$ ufc/mL de viables con una reducción del 33 %. Sin embargo, esta concentración celular es suficiente como para ser utilizada como probiótico si tenemos en cuenta las dosis recomendadas por Colichon *et al.* (1991), quienes aplicaron una dosis de

$0,2 \times 10^6$ ufc/mL de *Lactobacillus acidophilus* vivo para valorar el efecto de ese germen sobre el peso vivo de ponedoras en el primer mes de vida. Además, hay que señalar que no se han encontrado referencias que valoren la supervivencia de lactobacilos en agua, pero sí se conoce que el tiempo de conservación de los mismos es muy variado y depende de los métodos de conservación y el sustrato utilizado.

En tal sentido (Kirsop y Sneell, 1984) emplearon el método de liofilización para la conservación de lactobacilos y partiendo de una concentración inicial de $5,7 \times 10^8$ ufc/mL con pérdidas de $0,4 \times 10^8$ ufc/mL durante este proceso, obtuvieron un conteo de viables de $5,2 \times 10^8$ ufc/mL al primer año, $5,0 \times 10^8$ ufc/mL a los cinco años, $4,5 \times 10^8$ ufc/mL a los 10 años, $4,6 \times 10^8$ ufc/mL a los 15 años y $4,6 \times 10^8$ ufc/mL a los 20 años; lo que muestra la supervivencia de los lactobacilos al proceso de liofilización durante largos períodos de tiempo.

Sin embargo, Columbus (1991) refiere que un estudio realizado por la Agencia Francesa Independiente de Análisis y Control en 1990, encontró que casi la mitad de 41 probióticos diferentes que fueron probados, no poseían cantidades detectables de organismos vivos, aunque no refleja el tiempo de conservación en que se analizaron las muestras. Havenaar y Huis (1992) plantearon que las variaciones en los resultados de los probióticos, pueden deberse a la variación en la concentración de los microorganismos viables suplementados en la dieta; aunque hay que destacar que no sólo la concentración de gérmenes viables influye en la supervivencia de las cepas probióticas, sino también, las características propias de ellas, para poder tolerar los factores ecológicos que incidan negativamente en su viabilidad. Por esto se debe prestar atención a los largos períodos de conservación de los alimentos suplementados con probióticos; así como los procedimientos empleados en la granulación del pienso, que someten a los microorganismos a temperaturas y presiones que no pueden resistir (Delbecque 1991; Guillot 2001).

Conclusiones

La cepa de *Lactobacillus sp.* permanece viable en el agua de bebida a temperatura ambiente por un periodo mayor de 90 días, en una concentración todavía adecuada para ejercer sus efectos probióticos, siendo el agua una buena vía para suministrar el probiótico a los animales.

Referencias.

AMIGO, S.; M. PÉREZ, R. PIAD, MARTA LAURENCIO, GRETHEL MILIÁN Y ANA JULIA RONDÓN: Evaluación de la actividad probiótica sobre algunos indicadores inmunológicos de un producto de exclusión competitiva en pollos de ceba, *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 26 (1):1-7, 2002.

APAJALAHTI, J. Y M. R. BEDFORD: Influencia de la alimentación de la microflora en el rendimiento avícola, *Cuadernos de Nutrición, Nuestra Cabaña*, (296): 69-71, 2000.

ARIAS, F.: Nuevo sistema para el control de enfermedades en las aves "EXCLUSION COMPETITIVA", p.66, Resúmenes II Congreso Nacional de Avicultura, La Habana, Cuba, p. 66, 1998.

CASTELLANOS, A. R. Y MARÍA DE LA LUZ OLMEDO: Evaluación de un probiótico para el control de *Salmonella* en pollos de engorde en Yucatán, *Vet. Méx.*, 30 (3): 243-248, 1999.

COLICHON, A.; I. COLUMBUS, M. ROZA, EVELIN VENEGAS Y A. PRIETO: Efecto de la administración oral de *Lactobacillus acidophilus* vivos sobre el peso de ponedoras comerciales, Informe preliminar de los 30 primeros días de vida, *Mundo Avícola*, 1 (4): 8-10, 1991.

COLUMBUS, I.: Probióticos en defensa del principio natural, *Mundo Avícola*, 1 (4): 34-35, 1991.

DELBECQUE, J.: Ecología microbiana intestinal, biorregulación y aplicaciones prácticas, *Anaporc*, 102: 32-52, 1991.

ENSMINGER, M. E.; D.J.E. OLDFIELD Y D. W. HEINEMANN: Feed and Nutrition, p.p. 532-536, Second Edition, Clovis, California, 1999.

GUILLOT, J. F.: Cómo utilizar correctamente los probióticos en avicultura, *Avicultura Profesional*. 19 (8/8): 3336, 2001.

HAVENAAR, R. Y J. H. J. HUIS IN' T VELD: Probiotics: A General View, en *The Lactic Acid Bacteria*, t1, pp. 151-170, (ed.) B. J. B. Wood, *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, England, 1992.

KIRSOP, B. E. Y J. J. S. SNEELL: Maintenance of Microorganisms, A manual of Laboratory Methods, p. 33, Academic Press Inc. Ltd. London, UK, 1984.

LA RAGIONE, R. M; GABRIELLA CASULA, S. M. CUTTING Y M. J. Woodward: *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in Poultry, *Veterinary Microbiology*, 79 (2): 133-142, 2001.

MILTENBURG, G.: Tendencia futura del uso de aditivos en nutrición aviar, *Rev. Avicultura Profesional*, 17 (9): 33-34, 1999.

SERRANO, PAULINA; MARÍA A. BRIZUELA, D. E. RODRÍGUEZ, O. ALMAZÁN, G. DELGADO, LOURDES BUENO, ZAIDA ZUAZNABA, IRMA IGLESIA, IBIS ALVAREZ, D. BETANCOURT Y D. SÁNCHEZ: Caracterización de cepas y estudio de la influencia de la fuente de carbono y su concentración para la producción de un preparado probiótico de bacterias lácticas, p. 326, Resúmenes V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, La Habana, Cuba. 2000.

SIMÓN, S. M.: Avances en el control de la *Salmonella*, *Rev. Industria Avícola*, 45 (12): 30-39, 1998.

STATISTIX® FOR WINDOWS: Analytical Software. Tallahassee, FL., 1996.

Datos originales expresados en $\times 10^8$ ufc/mL y su % correspondiente y datos transformados en log ufc/mL de la supervivencia del Lactobacillus spp en el agua de bebida

Días en el agua	Gérmenes viables ufc/mL			Gérmenes muertos		
	$\times 10^8$	%	Log	$\times 10^8$	%	Log
0	0,60	100	7,774	0	0	0
2	0,60	100	7,777	0	0	0
3	0,597	99,5	7,772	0,005	0,833	5,69
8	0,57	95,00	7,760	0,03	5	6,47
21	0,46	76,66	7,662	0,14	23,33	7,14
30	0,41	68,33	7,612	0,19	31,66	7,27
60	0,34	56,66	7,531	0,26	43,33	7,41
90	0,20	33,33	7,300	0,40	66,66	7,60